



Hepatocyte growth factor and its receptor/c-MET regulate both cell growth and invasion of human pancreatic cancer

長谷川, 恭久

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1605

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001605>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	はせがわ やす ひさ 長谷川 恭 久	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1068号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成9年3月31日	
学位論文題目	Hepatocyte growth factor and its receptor/c-MET regulate both cell growth and invasion of human pancreatic cancer (膵癌細胞の増殖及び浸潤能における肝細胞増殖因子（HGF）と そのレセプター（c-MET）の役割）	
審査委員	主査 教授 齋 藤 洋 一 教授 前 田 盛 教授 尾 原 秀 史	

論文内容の要旨

【緒言】

肝細胞増殖因子（HGF）は肝再生のみならず、癌の発育や進展において重要な因子であり、そのレセプターはプロト型癌遺伝子（c-met）の産物であるc-MET蛋白であることが知られている。また膵癌組織では正常膵と比較してHGFとc-METが過剰発現していることが報告されているが、その役割については未だ解析されていない。

膵癌は肝転移や後腹膜浸潤が多く、治癒切除が困難で予後は極めて不良であり、膵癌の転移・浸潤機序を解明することは膵癌治療の一助となることが期待される。

本研究ではヒト膵癌細胞株におけるc-MET（c-met）の発現を検索し、さらに膵癌の細胞増殖及び基底膜浸潤能に及ぼすHGFの役割について解析し、他の増殖因子と比較検討した。

【材料及び方法】

膵癌細胞におけるc-MET（c-met）の発現：ヒト膵癌細胞株（AsPC-1, BxPC-3, Panc-1及びMIA PaCa-2）を対象とした。まず各膵癌細胞からAGPC法で抽出したtotal RNAを電気泳動後、ナイロンフィルターにトランスファーした。ランダムプライマー法で³²P標識したp-met HDNAプローブを用いてノーザンブロットを行い、c-met mRNAの発現を調べた。次に膵癌細胞から細胞抽出液を採取、抗ヒトMETポリクローナリ抗体でウェスタンブロットを行い、c-MET蛋白の発現を調べた。細胞増殖能：測定96wellのプレートを用いて膵癌細胞 1×10^4 個/wellを10%FCSを含む培地下で24時間、前培養した。上清を除去しPBSで洗浄後、無血清培地下で各種濃度の増殖因子を加えて48時間培養した。生細胞数はWST-1 Cell Counting Kitで測定した。

基底膜浸潤能測定：基底膜浸潤能はMatrigel Invasion Chamberを用いて測定した。マトリゲルという合成基底膜をコートしたPET膜を隔てた上下（上がchamber, 下がwell）に無血清培地下で増殖因子を加え、PET膜を介した種々の濃度勾配（chamber/well：以下0/100や100/0と記載：増殖因子の単位はng/ml）を作成した。さらに膵癌細胞 1×10^5 個/chamberをPET膜上で培養、10時

間後にマトリゲルを分解しPET膜の8 μ mの穴を通過した癌細胞のみを染色、鏡検下で定量化して基底膜浸潤の程度の差を検討した。

【結果】

ノーザンブロットの結果、MIA PaCa-2を除く膵癌細胞（AsPC-1, BxPC-3とPanc-1）で約7 kbのc-met mRNAの発現がみられた。ウエスタンブロットでもMIA PaCa-2を除く膵癌細胞で約140kDaのc-MET蛋白の発現が確認された。

細胞増殖能に関しては、HGFはc-METを発現するAsPC-1, BxPC-3とPanc-1の細胞増殖を濃度依存性に促進させた。しかしc-METの発現を認めないMIA PaCa-2ではHGFの増殖促進効果はみられなかった。

基底膜浸潤能に関しては、Invasion Chamberの下段のwellにHGFを添加すると、MIA PaCa-2を除く膵癌細胞における浸潤細胞数は濃度依存性に増加した。しかし同じ濃度でも逆の濃度勾配に変えると、例えば正の濃度勾配0/100 (ng/ml)と負の勾配100/0 (ng/ml)を比較すると、後者の浸潤細胞数は前者の約50%であった。またMIA PaCa-2ではHGFの浸潤促進効果はみられなかった。

HGF以外の増殖因子（bFGF, EGF, PDGF-AAとPDGF-BB）についても同様の方法で細胞増殖及び基底膜浸潤能を測定した。検索した増殖因子の中でHGFのみが膵癌細胞の増殖を促進させた。基底膜浸潤に関しては、HGFとbFGFが膵癌細胞の基底膜浸潤を促進させ、bFGFの浸潤促進作用はHGFの約2倍であった。EGF, PDGF-AAやPDGF-BBではいずれの効果もみられなかった。

【考察】

検索した増殖因子の中でHGFのみがヒト膵癌細胞の増殖と基底膜浸潤の両方を濃度依存性に促進させた。その作用はc-METを発現する膵癌細胞にみられ、HGF活性はそのレセプターであるc-METを主として介しているものと推測された。また同じ濃度勾配でも正から負へ変えるとHGFの基底膜浸潤促進作用は減少することから、HGFはケモアトラクタントとして膵癌細胞の基底膜浸潤の方向性を規定する因子である可能性が示唆された。

一般にHGFは線維芽細胞など間葉系細胞が産生して上皮性細胞にパラクラインに働くとされている。今回検索した膵癌細胞にはELISAによる測定でHGFが発現していないことから、HGFは膵癌の増殖及び浸潤過程に主にパラクライン作用で関与すると思われる。さらに膵癌組織では正常膵と比較して約10倍のHGFの過剰発現がみられるとの報告から、膵癌は癌周囲の間質成分との交互作用で高濃度なHGFの状態を作り、転移や浸潤に好都合な環境を保つ可能性が示唆された。

【結語】

HGFはc-METを発現するヒト膵癌細胞の増殖を促進させ、かつケモアトラクタントとして浸潤能も促進させた。膵癌をとりまく微小環境において膵癌細胞はHGFの多い隣接した環境へと浸潤して増殖することが考えられ、HGFとc-METが膵癌の転移過程に深く関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

肝細胞増殖因子（HGF）は肝再生のみならず、癌の発育や進展において重要な因子であり、そのレセプターはプロト型癌遺伝子（c-met）の産物であるc-MET蛋白であることが知られている。また

膵癌組織では正常膵と比較してHGFとc-METが過剰発現していることが報告されているが、その役割については解析されていない。本研究者はヒト膵癌細胞株におけるc-MET (c-met)の発現を検索し、さらに膵癌の細胞増殖及び基底膜浸潤能に及ぼすHGFの役割について解析し、他の増殖因子と比較検討した。

実験はヒト膵癌細胞株 (AsPC-1, BxPC-3, Panc-1及びMIA PaCa-2) を用いた。まず、p-met H DNAプローブでノーザンブロットを抗ヒトMETポリクローナリ抗体でウェスタンブロットを行い、膵癌細胞のc-met mRNA及びc-MET蛋白の発現を調べた。次に無血清培地で各種濃度の増殖因子を加えて48時間培養し、WST-1 Cell Counting Kitで細胞増殖能を測定した。基底膜浸潤能に関してはMatrigel Invasion Chamberを用いて種々の濃度勾配での基底膜浸潤の程度を測定した。

その結果HGFはc-METを発現するヒト膵癌細胞の増殖を促進させ、かつケモアトラクタントとして基底膜浸潤能も促進させる成績が得られた。すなわち膵癌をとりまく微小環境において膵癌細胞はHGFの多い隣接した環境へと浸潤して増殖することが考えられ、HGFとc-METが膵癌の転移過程に深く関与しているものとの結論を導き出している。

本研究は膵癌の転移様式について、その増殖および浸潤機序を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったHGFの関与について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。